

Università degli studi di Napoli, Federico II

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dottorato in Medicina Molecolare, XIX Ciclo

Indirizzo Neuroscienze

Coordinatore Prof. Lucio Annunziato

Tesi di Dottorato

**“ANALISI DEI MECCANISMI MOLECOLARI DI MORTE NEURONALE INDOTTA DA
MUTANTI DI LRRK2”**

Relatore

Candidato

Prof. Paolo BARONE

Dr. Carmine VITALE

Anno Accademico 2007-2008

INDICE

• <i>Introduzione</i>	3- 5
• <i>Obiettivi</i>	6
• <i>Materiali e Metodi</i>	7 – 11
• <i>Risultati</i>	12 – 18
• <i>Discussione</i>	19 – 23
• <i>Legenda alle figure</i>	24 – 26
• <i>Figure</i>	27 – 30
• <i>APPENDICE A</i>	31 – 38
• <i>Bibliografia</i>	39 - 45

Introduzione

La malattia di Parkinson (MP) è una patologia degenerativa del sistema nervoso centrale (SNC) caratterizzata clinicamente dalla presenza di tremore, bradicinesia/acinesia, rigidità ed instabilità posturale. Da un punto di vista anatomo-patologico la MP è caratterizzata dalla perdita progressiva dei neuroni dopaminergici della substantia nigra (SN), associata alla formazione di aggregati fibrillari composti di α -sinucleina ed altre proteine cellulari (Lewy Bodies e Lewy neurites) [1,2]. La progressiva riduzione dei neuroni dopaminergici della SN *pars compacta* è responsabile della deplezione di dopamina a livello del caudato-putamen (CP) e di conseguenza della comparsa dei sintomi motori della MP. Sebbene la patogenesi della MP resti per molti versi ancora oscura e solo in parte chiarita, appare evidente il contributo sia di fattori ambientali che di una suscettibilità genetica al suo determinismo [3].

L'identificazione di rare forme di parkinsonismo familiare ed il successivo clonaggio delle mutazioni geniche responsabili, hanno fornito un contributo essenziale alla comprensione dei meccanismi molecolari all'origine della MP. I geni le cui mutazioni sono state associate alla comparsa di parkinsonismo comprendono: α - sinucleina, parkina, DJ-1, PINK-1 e ATP13A2 [4,5]. Recentemente sono state altresì identificate mutazioni specifiche nella sequenza del gene codificante per la proteina LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase*, PARK8), responsabili di una forma familiare di MP a trasmissione autosomico-dominante (AD) [6,7]. In aggiunta molte delle

famiglie portatrici delle mutazioni LRRK2, esibiscono un fenotipo clinico ed un profilo neurochimico *in vivo*, del tutto sovrapponibili a quelli osservati nella MP idiopatica [8].

Diversi studi epidemiologici, condotti da gruppi indipendenti, hanno stimato la frequenza delle mutazioni patogene di LRRK2 in differenti popolazioni e gruppi etnici. Le mutazioni di LRRK2 sono responsabili del 5-6% delle forme familiari di MP e di circa 1-2% delle forme sporadiche [9,10]. LRRK2 è una proteina di 2527 aminoacidi composta da differenti domini funzionali indipendenti tra loro: 1) dominio ROC (Ras in complex proteins) GTPasi seguito dal 2) dominio COR (C-terminal of ROC); 3) dominio LRR arricchito in ripetizioni di Leucina; 4) dominio catalitico chinasi appartenente alla famiglia TKL (Tyrosine kinase-like); 5) dominio C-terminale WD40 e 6) dominio N-terminale ankirino-simile (APPENDICE A). Le mutazioni patologiche finora identificate nella sequenza codificante del gene LRRK2 interessano tutti i domini funzionali della proteina. La modalità di trasmissione di tipo autosomico dominante (AD) induce a ritenere che un meccanismo di “*gain of function*” possa essere all’origine del fenotipo patologico. In accordo con questa ipotesi è l’osservazione di un incremento dell’attività chinasi della proteina mutata nei vari studi finora condotti [11,12].

Il ruolo dell’apoptosi nell’induzione della deplezione neuronale osservata nella MP appare ancora controverso. Diversi studi sostengono un chiaro contributo del processo apoptotico nel determinismo dei processi di morte neuronale osservati soprattutto a carico della SN nei pazienti affetti da MP [13,14], laddove altri sembrano non

sostenere tali risultati [15]. Questa apparente discrepanza potrebbe essere spiegata considerando il decorso lentamente progressivo della MP; è possibile infatti che solo una piccola percentuale di neuroni dopaminergici presenti dei chiari segni di morte cellulare in un dato intervallo temporale. D'altro canto la presenza di marcatori apoptotici è stata ben caratterizzata in animali da esperimento trattati sia con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) che con 6-idrossidopamina le due principali tossine adottate come paradigmi di parkinsonismo sperimentale [13,16].

Obiettivi dello Studio

Nel presente studio abbiamo valutato il contributo dell'apoptosi nei meccanismi di morte neuronale indotti da differenti mutazioni del gene LRRK2 in due linee cellulari eucariotiche. In aggiunta abbiamo esplorato il ruolo dei domini proteici LRR e WD40 nell'induzione dei processi di morte neuronale utilizzando differenti mutanti di delezione di LRRK2.

Materiali e Metodi

Costruzione dei Plasmidi

Il cDNA corrispondente alla sequenza umana di LRRK2 (accession no NM_198578) è stato ottenuto mediante amplificazione RT-PCR a partire da mRNA estratto da linfoblasti umani. Diverse PCR sono state effettuate allo scopo di amplificare tre regioni contigue del gene: 1) dal 5' al sito di restrizione *XbaI* (3733 paia di basi); 2) dal sito *XbaI* al sito *ClaI* (1396 paia di basi) e 3) dal sito *XbaI* alla regione 3' del gene (2455 paia di basi). I tre frammenti così generati sono stati clonati insieme e successivamente sottoclonati nei seguenti vettori di espressione eucaristici: pCMV-Tag2B (1X-FLAG-tag, Stratagene), pCMV-Tag3B (1X-myc-tag, Stratagene) o nel vettore pCS2-MTK (5X-myc-tag [38]). Le mutazioni puntiformi R1441C, Y1699C e G2019S e le delezioni Δ LRR (aminoacidi 1033-1040), Δ WD40 (aminoacidi 2168-2510) sono stati generati adoperando il kit di mutagenesi sito-diretta Quickchange prodotto dalla Stratagene. Negli esperimenti di co-transfezione con i costrutti LRRK2 abbiamo adoperato come sistemi rivelatori pLantern GFP (GIBCO BRL) in un rapporto di 5:1 e pJojo-APAF1 [20] in un rapporto di 1:1. Per il saggio dell'attività chinasi in vitro abbiamo utilizzato come controllo positivo un plasmide codificante per la proteina umana Aurora-A clonato in un vettore di espressione pCS2-MTK [39].

Anticorpi

Nel presente studio abbiamo adoperato i seguenti anticorpi: mouse anti-myc (clone 9E10 Sigma-Aldrich, diluizione finale 1:1000), rabbit anti-cleaved caspase 3 (Cell signaling, diluizione finale 1:1000 per WB e 1:100 per immunofluorescenza), rabbit anti-caspase 3 (Cell signaling, diluizione finale 1:1000), mouse anti-b-actin (Sigma-Aldrich, diluizione finale 1:1000), mouse anti-cytochrome *c* (Promega, diluizione finale 1:1000), Apaf1 (Cell signaling, diluizione finale 1:1000).

Transfezione

La linea cellulare SH-SY5Y da neuroblastoma umano (ATCC number CRL-2266) è stata cresciuta in DMEM-F12 addizionato a 10% di siero fetale (FCS, invitrogen) a 37°C, mentre le cellule ETNA +/+ e -/- [20] sono state cresciute in DMEM-F12 addizionato a 10% di siero fetale a 33°C. L'espressione transiente di ciascun vettore (1,5 µg DNA/ 5-7x10⁵ cellule) è stata ottenuta addizionando il reagente LipofectAMINE Plus (Invitrogen) secondo le indicazioni fornite dal produttore. Dopo tre ore di incubazione con i reagenti di transfezione, le cellule sono state pilastrate in presenza di normale mezzo di crescita per 24-48 ore.

Western Blot Analysis

Dopo aver lavato le colture cellulari con PBS (phosphate buffered saline), le cellule sono state lisate mediante lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) contenente 1 mM PMSF e un cocktail di inibitori delle proteasi (Sigma-Aldrich). La centrifugazione dei lisati a 17 000 g per 10 min produceva un supernatante ben definito. La concentrazione proteica è stata determinata mediante il saggio proteico Bradford (Bio-Rad). 20 µg di estratti proteici sono stati fatti migrare in un gel standard SDS/PAGE. I campioni sono stati poi trasferiti su un filtro di Protan Nitrocellulosa (Schleicher & Schuell GmbH). Le membrane sono state incubate in una soluzione contenente PBS 1X, latte magro al 5% e l'anticorpo specifico per 16 ore a 4°C. Gli immunocomplessi sono stati rivelati in presenza anticorpi anti-rabbit (Donkey anti-rabbit-HRP; Jackson Laboratories) e anti-mouse (goat anti-mouse-HRP; Sigma-Aldrich) mediante reazione di chemiluminescenza (Pierce).

Immunofluorescenza Diretta

Le cellule sono state cresciute su piastre del diametro di 35 mm, fissate con una soluzione di paraformaldeide al 4% e PBS all'1% e permeabilizzate con una soluzione di Triton X-100 in PBS 1X. Le cellule sono state successivamente "bloccate" con una soluzione contenente 5% BSA in 1X PBS – 0.05% Tween 20, ed incubate O/N a 4°C in presenza dell'anticorpo specifico. Il giorno successivo le cellule sono state lavate con una soluzione contenente 1X PBS – 0.05% Tween 20 ed

incubate in presenza di un anticorpo secondario Cy3-conjugated anti-mouse o anti-rabbit ad una diluizione di 1:500 (Jackson Laboratories). Prima di essere osservate al microscopio le cellule sono state colorate con Hoechst 33342 (1 mg/ml; Sigma-Aldrich). La raccolta delle immagini è stata effettuata mediante un microscopio Leica DMLB dotato di una lampada HBO 100-W.

Quantificazione dell'apoptosi

Le linee cellulari trasfettate con i plasmidi contenenti i costrutti LRRK2 WT e mutati unitamente al sistema rivelatore GFP pLantern in un rapporto 5:1, sono state analizzate dopo 48 ore dalla transfezione. In alcuni esperimenti abbiamo aggiunto l'inibitore solubile Z-VAD-fmk (100mM) subito dopo la trasfezione. La quantificazione dei nuclei apoptotici è stata realizzata mediante conta diretta dopo colorazione nucleare con Hoechst 33342. Per ognuna delle condizioni sperimentali adottate sono state contate 100 cellule GFP positive presenti nei campi selezionati in maniera casuale. Solo le cellule contenenti dei nuclei chiaramente picnotici sono state considerate apoptotiche.

Immunoprecipitazione

A distanza di 48 ore dalla trasfezione, le cellule ETNA sono state lisate in 0,5 ml di Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 1mM NaF, 1mM Na3VO4, cocktail di inibitori delle proteasi). Dopo la centrifugazione a 12000g per 10 min a 4°C, il supernatante è stato posto a 4° C per un'ora dopo essere stato

addizionato con 10 μ l di una miscela contenente 1:1 di Proteina A e G-Sefarosio (Roche). Successivamente è stato aggiunto l'anticorpo anti-myc (Sigma) ad una diluizione di 1:1000. Dopo un'incubazione O/N a 4°C gli immunoprecipitati sono stati raccolti previa aggiunta di 20 μ l di una miscela contenente 1:1 di Proteina A e G-Sefarosio (Roche). Gli immunoprecipitati sono stati lavati tre volte in Lysis Buffer e due volte in Kinase Buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1%, 50 mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM NaF, 1mM Na₃VO₄, cocktail di inibitori delle proteasi). Una quota pari ad 1/20 dell'immunoprecipitato è stato analizzato mediante WB.

Saggio dell'attività chinasi in vitro

Il saggio dell'attività chinasi è stato effettuato in 30 μ L di buffer chinasi contenente 0,5 mg/ml di MBP (Sigma), 2 μ Ci [γ -³²P]ATP, 50 μ M ATP, 25 mM β -glicerolfosfato, 1mM NaF, 1mM Na₃VO₄, cocktail di inibitori delle proteasi. La mix di reazione è stata incubata a 37°C per 20 minuti. La reazione è stata interrotta mediante l'aggiunta di 30 μ l di una soluzione contenente 2X Laemli / SDS. I prodotti di reazione sono stati poi denaturati per 5 minuti a 95°C. Le proteine sono state separate mediante un gel standard SDS-PAGE e analizzate mediante autoradiografia.

Risultati

Espressione e localizzazione cellulare di LRRK2

Il cDNA completo di LRRK2 è stato ottenuto mediante RT-PCR condotta su RNA totale estratto da linfociti umani. Le mutazioni puntiformi R1441C, Y1699C e G2019S, sono state generate mediante PCR. Tutti i cDNA codificanti per le diverse forme di LRRK2 sono stati clonati in differenti vettori di espressione eucariotica con o senza tag (1X-FLAG o 1x/5x myc-tag) (Figura 1A). Tutti i costrutti così generati sono stati trasfettati in cellule SH-SY5Y e le stesse sono state analizzate a distanza di 24 ore dalla trasfezione. I livelli di espressione di 5X-myc-LRRK2 sono stati determinati mediante WB su estratti proteici ottenuti a partire dalle cellule trasfettate in maniera transiente. L'analisi mediante WB ha evidenziato la presenza di bande proteiche nell'intervallo di peso molecolare atteso (Figura 1B). Non sono emerse differenze nei livelli di espressione proteica tra le forme WT e mutate di LRRK2 (Figura 1B). Tutti i costrutti di LRRK2 generati sono stati altresì analizzati mediante immunofluorescenza. Gli esperimenti di immunofluorescenza, condotti utilizzando anticorpi anti-myc, hanno mostrato una localizzazione citoplasmatica dei costrutti LRRK2 WT e mutati, come precedentemente descritto in letteratura [12] (Figura 1C). Risultati simili sono stati ottenuti adoperando gli altri costrutti generati sebbene le proteine di fusione coniugate con 1X-myc e 1X-FLAG fossero difficilmente evidenziabili mediante WB effettuato con anticorpi specifici diretti contro i due epitopi (dati non mostrati).

Analisi dei meccanismi di morte neuronale indotti dai mutanti LRRK2

Sebbene diversi autori abbiano postulato un possibile coinvolgimento di LRRK2 nei processi di tossicità cellulare [17,18], i meccanismi molecolari alla base di tali fenomeni non sono stati ancora delucidati. Allo scopo di indagare il ruolo dell'apoptosi nel determinismo dei fenomeni di morte neuronale dipendenti da LRRK2 abbiamo cotrasfettato cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y con i costrutti GFP e 5x-myc-LRRK2 descritti nella sezione dei materiali e metodi. L'attività apoptotica è stata successivamente quantificata all'interno delle cellule GFP-positive [19]. Come mostrato nelle figure 2A e 2B, l'analisi di immunofluorescenza rivela come l'espressione del mutante LRRK2-R1441C induca la condensazione dei nuclei in un'elevata percentuale di cellule trasfettate rispetto alle cellule trasfettate con la forma WT di LRRK2 (Figura 2B). La modesta seppur significativa tossicità osservata nelle cellule trasfettate con la forma WT di LRRK2 è da imputare agli elevati livelli di proteine presenti nelle cellule trasfettate in maniera transiente, una condizione quest'ultima in cui l'attività chinastica di LRRK2 sfugge ad un controllo ottimale. Nel nostro sistema cellulare in vitro abbiamo altresì valutato l'attivazione della caspasi 3 a 24 ore di distanza dalla trasfezione. Come mostrato nella figura 2C, la caspasi 3 attivata è ben evidente nelle cellule trasfettate con il mutante LRRK2-R1441C. Inoltre, l'aggiunta dell'inibitore solubile delle caspasi z-VAD-fmk inibisce l'attivazione della caspasi 3 (Figure 2C e D) e la condensazione dei nuclei riconducibili alla presenza dei mutanti LRRK2. Analoghi risultati sono ottenuti anche quando vengono trasfettati mutanti LRRK2 coniugati con 1x-flag, 1x-

myc ovvero mutanti non coniugati a tag, a sottolineare come la presenza di 5x-myc non è in grado di alterare, esaltandolo, il profilo di tossicità di LRRK2-R1441C. I risultati da noi conseguiti suggeriscono che all'interno di una linea cellulare neuronale, l'attivazione della caspasi 3 è il principale mediatore della morte cellulare in presenza di una mutazione di LRRK2.

Apaf1 KO previene la morte cellulare dipendente dall'espressione dei mutanti LRRK2

Per definire in maggior dettaglio i meccanismi molecolari soggiacenti all'apoptosi indotta dai mutanti di LRRK2, abbiamo adottato una linea cellulare neuronale difettiva del fattore Apaf1 (ETNA $-/-$, embryonic telencephalic naive Apaf1 knock-out) [20]. Apaf1 è una proteina *scaffold* che partecipa insieme con la pro-caspasi-9 e con il citocromo *c* alla formazione dell'apoptosoma, responsabile a sua volta dell'attivazione della cascata delle caspasi [19]. Le cellule deficienti di Apaf1 (ETNA $-/-$) e le cellule esprimenti Apaf1 (ETNA $+/+$) sono state trasfettate con le forme WT e mutate di LRRK2 e sono state esposte a diversi stimoli proapoptotici a monte e a valle di Apaf1. Come mostrato nella figura 3A (linea superiore), nelle cellule ETNA $+/+$, la trasfezione transiente dei mutanti LRRK2 comporta un incremento nell'attivazione della caspasi 3 rispetto ai controlli. Al contrario nelle cellule ETNA $-/-$ non si osserva attivazione della caspasi 3 con nessuno dei costrutti LRRK2. Usando un anticorpo specifico diretto contro Apaf1, abbiamo confermato la presenza dello

stesso solo all'interno delle cellule ETNA+/+, ma non in quelle ETNA-/- (Figura 3A, linea inferiore). Per escludere differenze nei livelli di trasfezione ovvero nel caricamento delle proteine, tra le due linee cellulari, abbiamo effettuato un WB utilizzando anticorpi anti-myc-tag e anti-caspasi-3 totali sui medesimi estratti proteici (Figura 3A, linea mediana). L'assenza di apoptosi nelle cellule ETNA -/- trasfettate con mutanti LRRK2, è stata confermata previa quantificazione dei nuclei picnotici (Figura 3B) nelle cellule trasfettate come precedentemente descritto nella figura 2. Al contrario l'espressione dei mutanti LRRK2 induce in entrambi i tipi cellulari il rilascio del citocromo *c* (Figura 3C), confermando la normale attivazione del circuito apoptotico a monte. Sebbene il citocromo *c* sia normalmente rilasciato nelle cellule ETNA -/- trasfettate con i mutanti LRRK2, solo una piccola percentuale di nuclei picnotici è stata osservata nella medesima linea cellulare (Figura 3B). La mancata attivazione della caspasi 3 e la ridotta formazione di nuclei picnotici in tali cellule suggerisce che la morte cellulare indotta dai mutanti LRRK2 derivi da una disfunzione mitocondriale ovvero da una alterata formazione dell'apoptosoma. Inoltre, allo scopo di escludere un eventuale contributo ai meccanismi di morte cellulare derivante da un over-espressione dei mutanti LRRK2 nelle cellule ETNA -/- ed indipendente dai processi apoptotici, abbiamo valutato il rapporto tra le cellule GFP-positive ed il totale delle cellule ETNA -/- trasfettate con i differenti costrutti di LRRK2. A tal proposito non abbiamo osservato differenze significative nella percentuale di cellule GFP-positive nell'ambito delle cellule ETNA-/- trasfettate con GFP da solo o in combinazione con la forma WT e mutata di LRRK2 a distanza di 48

ore dalla trasfezione (GFP: $130 \pm 9/50$; GFP e LRRK2: $123 \pm 7/500$; GFP e LRRK2-R1441C: $125 \pm 10/500$).

Nell'intento di dimostrare che la protezione dalla morte cellulare osservata nelle cellule ETNA^{-/-} è un fenotipo monogenico, abbiamo cotrasfettato il mutante LRRK2-R1441C con un costrutto recante il cDNA di Apaf1 sotto il controllo del promotore costitutivo forte CAGGs. Come dimostrato nella figura 3D, la presenza di Apaf1 nelle cellule ETNA^{-/-} ripristina l'attivazione della caspasi 3 indotta dal mutante R1441C 24 ore dopo la trasfezione. Tali risultati dimostrano che la mancanza di morte cellulare dipendente da R1441C nelle cellule ETNA^{-/-} dipende in maniera esclusiva dall'assenza del fattore pro-apoptotico Apaf1.

Ruolo dei differenti domini funzionali di LRRK2 nella localizzazione cellulare e nei meccanismi di morte cellulare

LRRK2 è una proteina composta da differenti domini funzionali e le mutazioni patologiche finora identificate sono presenti in molti di essi [21]. La presenza di numerosi domini funzionali sembra suggerire un ruolo di *scaffold protein* per LRRK2, ovvero una sorta di piattaforma metabolica a livello della quale ha luogo l'assemblaggio di differenti partner proteici che possono modulare positivamente o negativamente le attività chinasiche di LRRK2. A tale proposito nel presente studio abbiamo valutato il contributo dei domini proteici LRR e WD40 nei meccanismi di tossicità mediati da LRRK2 in presenza o in assenza della mutazione puntiforme

R1441C che è nota essere associata ad un incremento dell'attività chinasica. I costrutti di DNA rappresentati nella figura 4A sono stati trasfettati all'interno di cellule SH-SY5Y. Il livello di espressione proteica è stato valutato mediante WB usando anticorpi anti-myc-tag (Figura 4B). LRRK2 Δ LRR e Δ WD40 presentavano livelli di espressione confrontabili indipendentemente dalla presenza della mutazione R1441C (Figura 4B). La capacità dei singoli costrutti di indurre la morte cellulare è stata valutata monitorando i livelli di attivazione della caspasi 3. Nonostante la bassa resa di trasfezione conseguita per ciascuna condizione sperimentale (10-20% delle cellule), abbiamo osservato più di 100 cellule GFP positive in grado di attivare la caspasi 3 fino a livelli statisticamente significativi. Entrambi i mutanti di delezione, indipendentemente dalla presenza di R1441C, erano incapaci di indurre l'attivazione della caspasi 3 (Figura 4C e D) e la condensazione dei nuclei (dati non mostrati). L'assenza della tossicità cellulare non era riconducibile ad una differente localizzazione cellulare in assenza dei domini LRR e WD40, dal momento che, come osservato nella figura 4E, non sono state osservate differenze significative nella distribuzione cellulare della proteina tra la forma WT e i diversi mutanti di delezione. Infine abbiamo analizzato l'attività chinasica dei mutanti di delezione generati valutando la percentuale di fosforilazione di un substrato aspecifico quale la proteina basica della mielina (MBP). Come mostrato in figura 4F e 4G, la delezione del dominio LRR non sembra alterare in vitro l'attività chinasica della proteina indipendentemente dalla presenza della mutazione R1441C. Tuttavia, come atteso, la presenza della mutazione puntiforme determina un incremento dell'attività chinasica

basale. Al contrario la delezione del dominio WD40 si accompagna ad una riduzione dell'attività chinastica, che in presenza della mutazione puntiforme R1441C viene ripristinata a livelli assimilabili a quelli della proteina WT.

Discussione

Le mutazioni nel gene codificante per LRRK2 sono responsabili del 5-6% dei casi di parkinsonismo familiare AD ad esordio tardivo, e dell'1-2% dei casi sporadici di MP idiopatica [9,10]. Nell'ambito di questa popolazione di pazienti, nonostante l'omogeneità del fenotipo clinico, del tutto assimilabile a quello dei pazienti affetti da MP sporadica, è possibile osservare una grande variabilità nell'età di insorgenza e nelle caratteristiche neuropatologiche, suggerendo la possibilità di una variabilità patogenetica a monte dei processi degenerativi soggiacenti [6,22]. Diversi studi condotti su modelli animali murini hanno evidenziato una prevalente espressione di LRRK2 nelle aree di proiezione dopaminergica [23,24], laddove la stessa viene espressa in maniera ridotta, o per niente espressa, a livello delle aree di sintesi dopaminergica quali la SN e l'area ventrotegmentale [25,26]. Questo profilo di espressione unico, se confrontato con quello di altri geni coinvolti nella patogenesi della MP, pone la questione del contributo causale giocato dalle mutazioni di LRRK2 nel determinismo dei processi degenerativi osservati a carico dei neuroni dopaminergici della SN e della loro relazione con la comparsa del fenotipo clinico della MP. L'espressione dei mutanti di LRRK2 può indurre la deplezione dei neuroni dopaminergici sia direttamente che in maniera indiretta: le mutazioni di LRRK2 producono infatti un danno diretto a carico dei "medium spiny neurons" del caudato-putamen inficiando l'integrità anatomo-funzionale del circuito SN-nuclei della base ed indirettamente producono un'alterazione dell'omeostasi funzionale dei neuroni dopaminergici. In aggiunta le mutazioni di LRRK2 finora identificate producono un

incremento dell'attività chinastica della proteina [11] ed una riduzione nella lunghezza e nel livello di complessità dell'arborizzazione dei processi neuronali [27]. Ciononostante conosciamo ancora molto poco circa il ruolo funzionale in vivo della proteina e ancor meno in merito alla sua capacità di innescare e promuovere i processi degenerativi coinvolti nella patogenesi della MP.

I risultati del presente studio completano le evidenze emerse dai precedenti studi ed indirizzano la ricerca in due possibili direzioni. In primo luogo, abbiamo dimostrato che la tossicità neuronale indotta dalle mutazioni di LRRK2 passa attraverso l'attivazione della cascata apoptotica dipendente dal mitocondrio (Figura 2). La trasfezione transiente dei mutanti LRRK2 determina il rilascio del citocromo *c* e l'attivazione della caspasi 3 cui segue rapidamente la morte cellulare. Un'attivazione della caspasi 3 è stata altresì osservata in colture cellulari primarie di neuroni dopaminergici dopo infezione con vettori retrovirali recanti i costrutti di LRRK2 mutati [27].

L'utilizzazione di una linea cellulare neuronale difettiva per la formazione dell'apoptosoma (ETNA^{-/-}), un modello sperimentale in vitro già adoperato per lo studio dei fenomeni apoptotici in diverse patologie neurodegenerative [20,28], ci ha consentito altresì di dimostrare la relazione tra i processi di morte cellulare indotti dai mutanti LRRK2 e il fattore pro-apoptotico Apaf1, una proteina scaffold che partecipa all'assemblaggio dell'apoptosoma nei mammiferi [19]. Nelle cellule ETNA^{-/-} trasfettate con i mutanti LRRK2, l'assenza di Apaf1 inibisce l'attivazione della caspasi 3 e la condensazione dei nuclei, mentre il rilascio del citocromo *c* dal

compartimento mitocondriale avviene normalmente (Figura 3), individuando a valle dello stesso lo stallo del circuito apoptotico. Tali risultati sottolineano il ruolo di primo piano svolto dalla cascata apoptotica dipendente dal mitocondrio nell'induzione dei meccanismi di morte neuronale promossi dai mutanti di LRRK2 oltre ad individuare in Apaf1 un mediatore essenziale dell'intero processo. In accordo con i nostri risultati è l'osservazione che l'espressione di un mutante negativo di Apaf1 a livello striatale eserciti un ruolo protettivo contro la deplezione di neuroni dopaminergici e la deplezione di catecolamine striatali in un modello animale murino trattato con MPTP [29]. Nel nostro modello sperimentale l'assenza del fattore Apaf1 non protegge del tutto le cellule ETNA^{-/-} dalla morte cellulare indotta dai mutanti LRRK2. Come precedentemente riportato per altri sistemi cellulari, la morte cellulare può scaturire da meccanismi molecolari indipendenti dall'apoptosi o più probabilmente indipendenti dalla cascata Apaf1/caspasi 3 [30]. Tuttavia sulla base dei nostri risultati e dell'osservazione condotta da altri gruppi [31,32] di una associazione tra LRRK2 e la membrana mitocondriale, riteniamo che una disfunzione mitocondriale possa rappresentare l'epifenomeno di un danno promosso dai mutanti di LRRK2. Tale ipotesi è in linea con i dati recentemente conseguiti a proposito di altri geni responsabili di parkinsonismi familiari ad esordio precoce quali parkin, PINK-1 e DJ-1 in cui il ruolo patogeno delle mutazioni identificate passa attraverso una disfunzione mitocondriale [33]. Nei topi parkin^{-/-} l'analisi elettroforetica mediante gel bidimensionale ha mostrato una significativa riduzione delle proteine mitocondriali coinvolte nei processi ossidativi e di detossificazione cellulare [34].

PINK-1 è localizzato all'interno del mitocondrio e, sebbene i substrati della sua attività chinastica non siano stati ancora identificati, sembra giocare un ruolo protettivo nei confronti della riduzione del potenziale di membrana mitocondriale, conseguente all'introduzione di inibitori del proteasoma o in modelli di stress ossidativo indotto da staurosporina [35]. Infine, la funzione del gene DJ-1 sembra essere altresì legata al mitocondrio dal momento che i topi DJ-1^{-/-} esibiscono un incremento della denervazione striatale e della deplezione di neuroni dopaminergici indotta dalla tossina mitocondriale MPTP. Inoltre i neuroni corticali embrionali DJ-1^{-/-} presentano una spiccata sensibilità allo stress ossidativo ma non ad altri insulti non ossidativi [36].

I risultati del presente studio dimostrano infine il ruolo di primo piano dei domini proteici LRR e WD40 nella tossicità cellulare dipendente dai mutanti LRRK2. I domini LRR e WD40 sono coinvolti nelle interazioni proteina-proteina mediando l'interazione con altre fosfoproteine e organizzando tali substrati in complessi di signalling intracellulare attivati in risposta a processi di fosforilazione serina/treonina chinasi dipendenti [37]. In assenza di questi due domini proteici non abbiamo osservato attivazione della caspasi 3 e conseguentemente fenomeni apoptotici nei sistemi cellulari trasfettati in maniera transiente con i mutanti LRRK2. Le delezioni dei domini funzionali non alterano la localizzazione citoplasmatica della proteina; inoltre i mutanti di delezione Δ LRR e Δ LRR-R1441C presentano dei livelli di attività chinastica sovrapponibili rispettivamente a quelli della proteina WT e della proteina mutata in R1441C. Questi risultati suggeriscono che l'assenza del dominio LRR pur

non interferendo con l'attività chinastica della proteina, è responsabile della tossicità LRRK2 dipendente. Probabilmente il dominio LRR è coinvolto nell'interazione della proteina con altri partner molecolari sconosciuti e tale interazione è cruciale ai fini dei processi patologici innescati dai mutanti di LRRK2. Al contrario il mutante di delezione Δ WD-40 produce una riduzione parziale dell'attività chinastica, sebbene la cotrasfezione del mutante R1441C ripristini un livello di attività enzimatica sovrapponibile a quello della proteina WT. Sulla base di queste osservazioni riteniamo che l'assenza del dominio WD-40 possa inficiare l'attività enzimatica della proteina modificandone la configurazione tridimensionale ovvero interferendo con specifiche modificazioni post-traduzionali (cfr. fosforilazione) necessarie per una piena attivazione funzionale dell'enzima.

La caratterizzazione della cascata di signalling cellulare dipendente da LRRK2 e l'identificazione dei partner e dei substrati molecolari di LRRK2 apporterà dei contributi significativi alla comprensione dei meccanismi patogenetici all'origine della malattia di Parkinson.

Legenda alle figure

Figura 1: *Espressione di LRRK2 in cellule SH-SY5Y.* (A) Rappresentazione schematica dei costrutti WT e mutati di LRRK2 (B) Analisi WB su estratti proteici di cellule SH-SY5Y cotransfettati con LRRK2 WT e mutata. (C) Immunofluorescenza diretta che evidenzia la localizzazione citoplasmatica di LRRK2 WT e mutata

Figura 2: *I mutanti di LRRK2 inducono la morte cellulare in cellule SH-SY5Y.* (A) Immunofluorescenza diretta dei nuclei apoptotici. (B) Analisi quantitativa dei nuclei apoptotici 48h dopo la transfezione. (C) Immunofluorescenza con Ab anti caspasi-3 attivata in presenza e in assenza di un inibitore solubile delle caspasi (z-VAD-fmk). (D) Analisi quantitativa delle cellule positive per caspasi-3 attivata 48h dopo la transfezione in presenza ed in assenza di z-VAD-fmk.

Figura 3: *La morte cellulare indotta dai mutanti di LRRK2 è dipendente dall'attivazione dell'Apoptosoma.* Le cellule ETNA +/+ e -/- sono state transfettate con i vettori indicati. (A) Analisi WB con Ab anti-caspasi-totali, anti-caspasi-3 attivata, anti-myc e anti-Apaf1 effettuata su estratti proteici cellulari. (B) Percentuale di nuclei apoptotici nelle cellule ETNA +/+ e -/- dopo cotransfezione con GFP e LRRK2 WT e mutata. (C) Immunofluorescenza con Ab anti-citocromo C. (D) Colorazione anti-caspasi-3 attivata in cellule ETNA -/- transfettate con mutanti R1441C in presenza o in assenza di Apaf1.

Figura 4: Analisi del ruolo dei mutanti di delezione nei meccanismi di morte neuronale indotti da *LRRK2*. (A) Rappresentazione schematica dei costrutti di DNA codificanti per i mutanti di delezione *LRRK2*. (B) WB analysis dei mutanti di delezione Δ WD40 e Δ LRR sugli estratti proteici ottenuti dalle cellule SH-SY5Y trasfettate in maniera transiente (Ab anti-myc). L'omogeneità del caricamento è stata verificata mediante Ab anti- β -actina. (C) Immunofluorescenza con anticorpi anti caspasi 3 attivata su cellule trasfettate con differenti mutanti *LRRK2*. Si noti la mancata attivazione della caspasi 3 in presenza dei mutanti di delezione R1441C ^{Δ LRR} e R1441C ^{Δ WD40} rispetto a R1441C da solo. (D) Quantificazione delle cellule positive per caspasi 3 attiva a distanza di 24 ore dalla trasfezione con i costrutti indicati. (E) Immagine al microscopio confocale della immunolocalizzazione dei mutanti *LRRK2* ^{Δ LRR} e *LRRK2* ^{Δ WD40} in presenza ed in assenza della mutazione puntiforme R1441C, all'interno di cellule SH-SY5Y. (F) Attività chinasi dei diversi costrutti *LRRK2*. Le cellule ETNA sono state trasfettate con plasmidi di espressione codificanti *LRRK2* coniugata ad un tag myc nella forma WT ed nella forma mutata R1441C, Δ LRR, Δ WD40, Δ LRR-R1441C, Δ WD40-R1441C e Aurora-A come controllo positivo (+); (-) cellule trasfettate con vettore vuoto. Le proteine estratte dalle cellule trasfettate sono state sottoposte ad immunoprecipitazione usando un anticorpo anti-myc. I complessi immunoprecipitati sono stati analizzati mediante WB (pannello superiore) per verificare l'omogenea espressione di ciascuna chinasi. Saggio di chinasi in vitro sui complessi immunoprecipitati effettuato usando MBP

come substrato. L'autoradiografia è mostrata nel pannello inferiore. (G)

Quantificazione di tre differenti esperimenti come mostrato in (F)

Figure 1

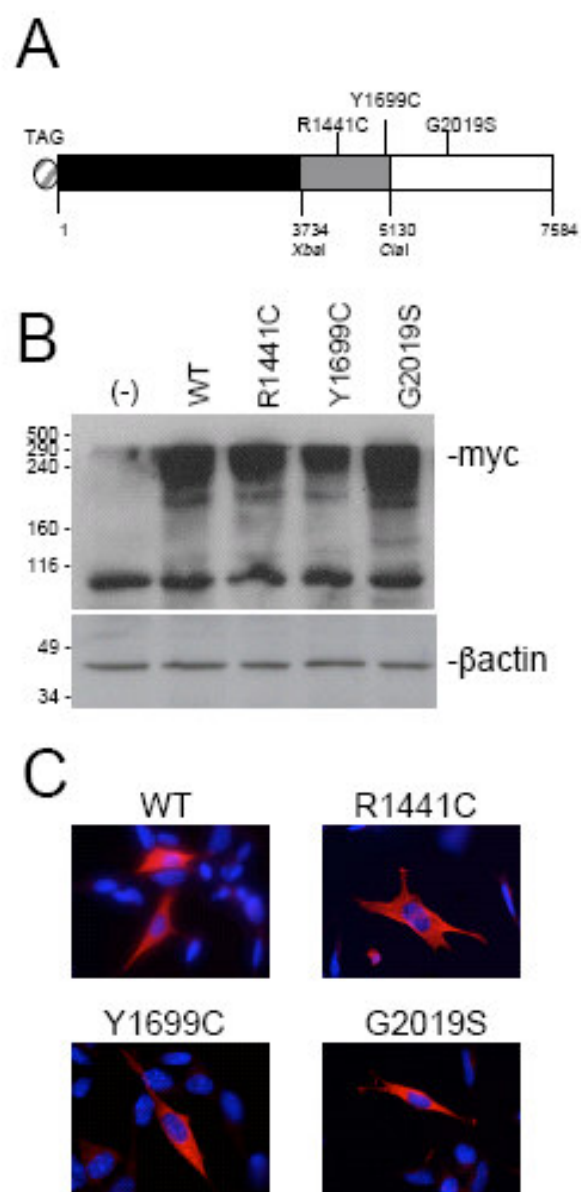


Figure 2

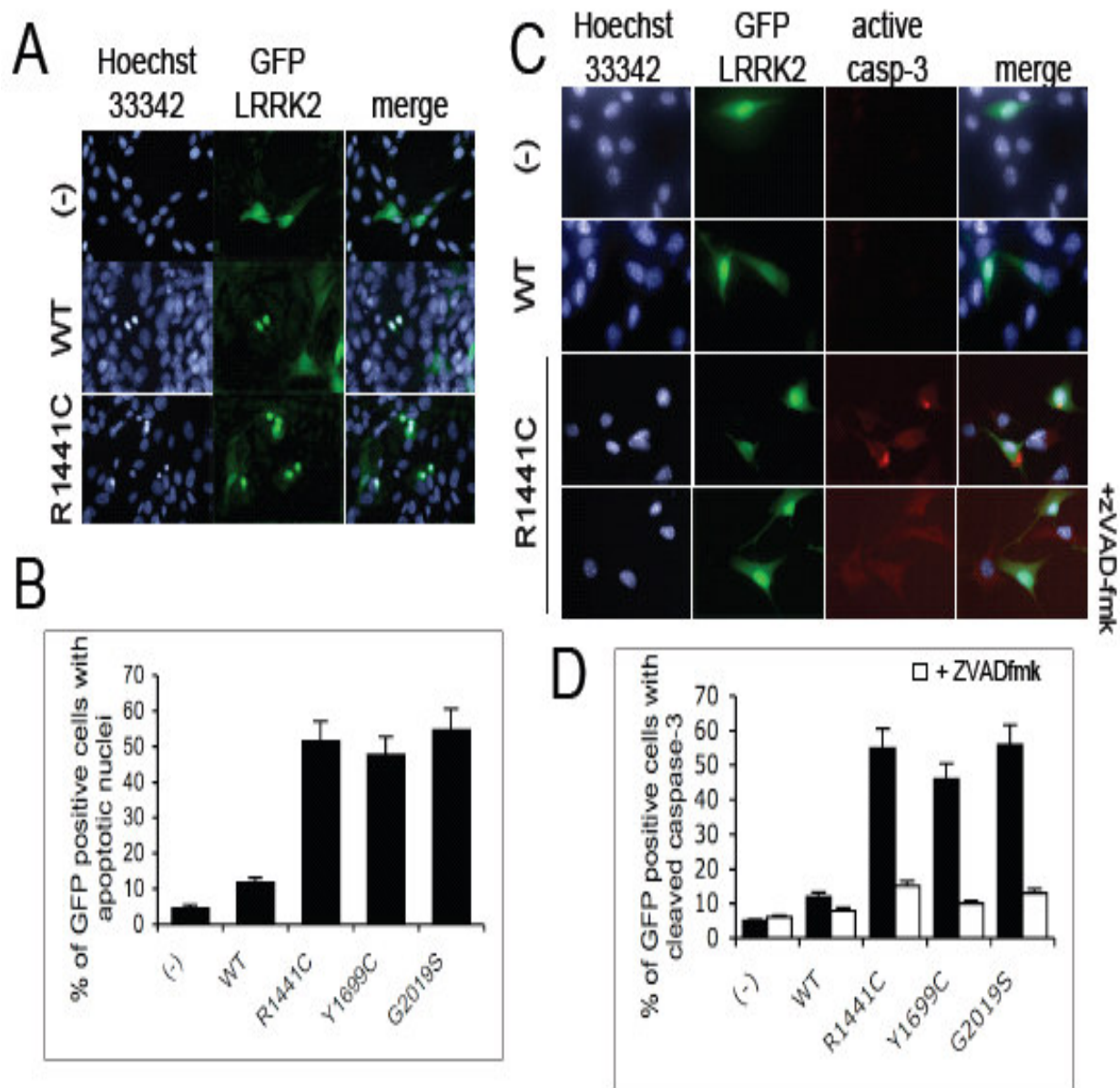
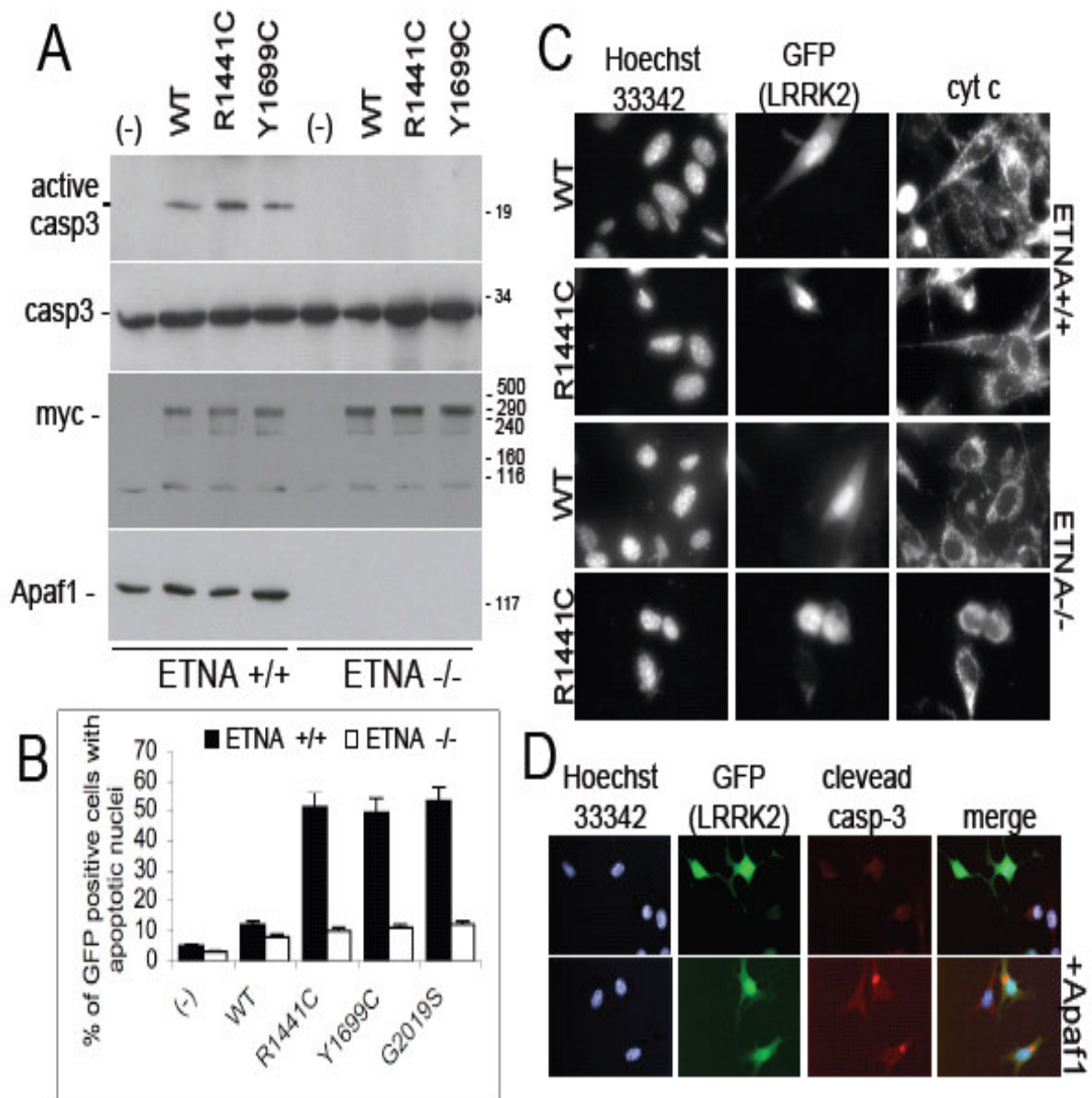


Figure 3



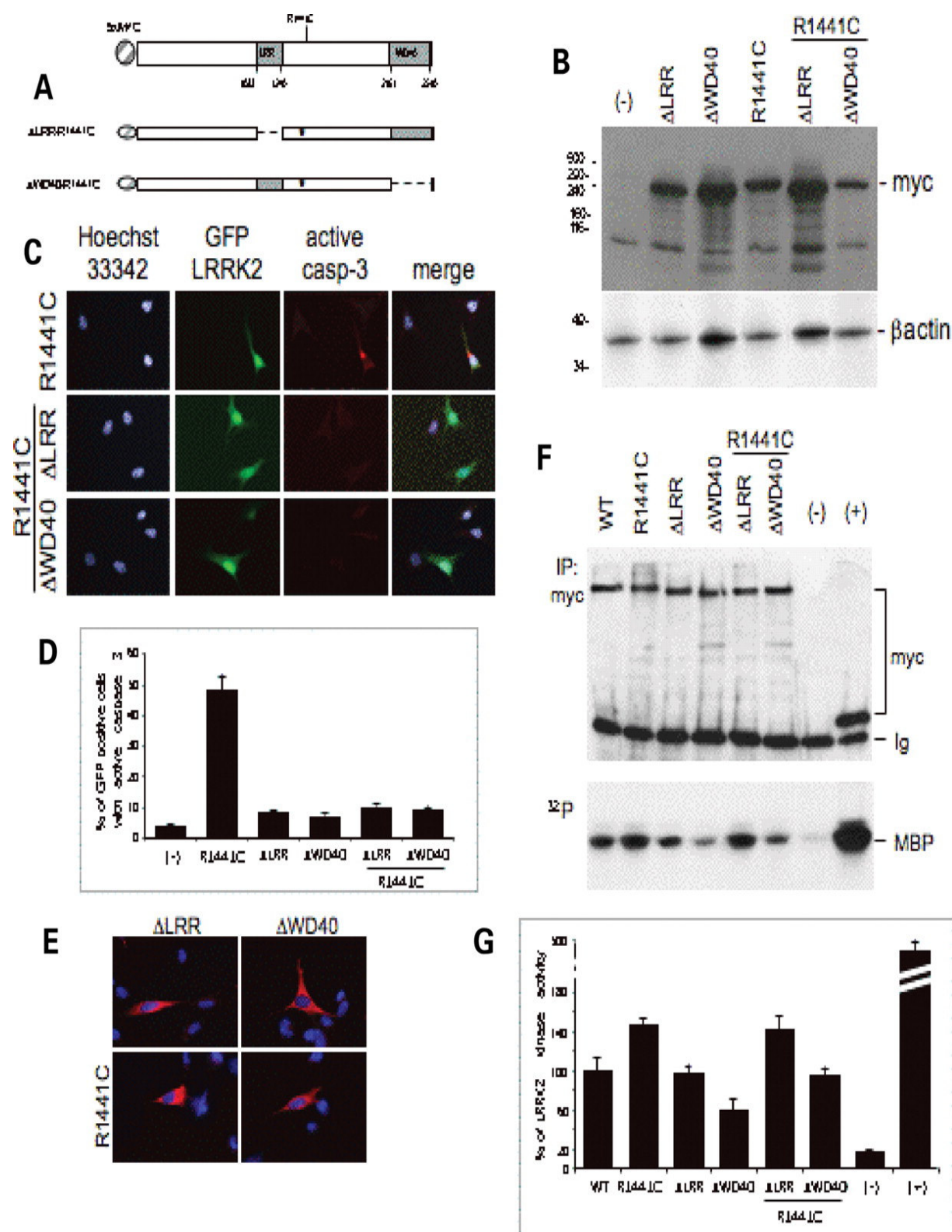


Figure 4

APPENDICE A

A.1 Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) : Caratteristiche strutturali e domini funzionali

Il gene *LRRK2* codifica per una proteina di 2527 aminoacidi contenente almeno 5 domini funzionali conservati – un dominio ricco di leucine (LRR, leucine-rich repeats) N-terminale, contenente un motivo di 22-28 aminoacidi ripetuto 12 volte, un dominio GTPasico Ras, una porzione COR (C terminal of ROC), una regione chinasi omologa alle MAP-chinasi-chinasi-chinasi (MAPKKK), e un dominio WD-40 [Figura 5]. La combinazione di questi motivi strutturali è altamente conservata nei vertebrati e mostra omologia con la famiglia delle proteine ROCO, in cui il dominio chinasi presenta una attività catalitica regolata dal dominio GTPasico [38].

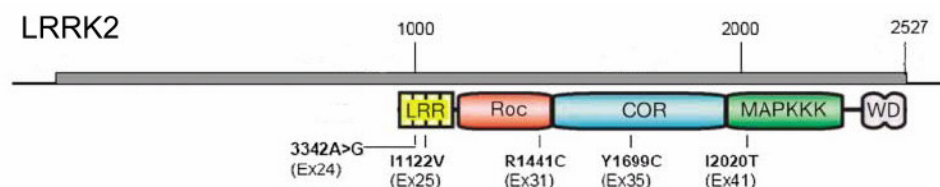


Figura 5. Struttura di *LRRK2* e suoi domini funzionali.

Leucine-rich repeats (LRR)

Il dominio LRR è costituito da 2-45 ripetizioni di 20-30 aminoacidi, che sono ripiegati a guisa di arco o ferro di cavallo. Le ripetizioni ricche in leucina si ritrovano in proteine virali, batteriche ed eucariotiche e sembrano rappresentare una piattaforma strutturale per la formazione di interazioni proteina-proteina. Tra le principali proteine contenenti domini LRR si annoverano i recettori tirosino-

chinasici, fattori di virulenza, glicoproteine di membrana; trasduzione del segnale, adesione cellulare, ricombinazione, trascrizione, apoptosi e risposta immunitaria sono alcuni dei processi biologici in cui i motivi LRR rivestono un ruolo significativo.

Da un punto di vista strutturale, i domini LRR hanno una struttura a ferro di cavallo, con un beta-foglietto parallelo situato sul lato concavo e elementi ad alfa-elica su quello convesso [Figura 6]. Sono state identificate almeno 6 famiglie di proteine LRR caratterizzate da ripetizioni con differenti lunghezze e sequenze consenso. In esse possiamo identificare una regione conservata, corrispondente al beta-foglietto ed all'ansa adiacente (contenente segmenti di 11 residui con sequenza LxxLxLxxN/CxL), ed una regione variabile, che contiene due semiripiegamenti alle estremità e un segmento centrale lineare, normalmente ad elica. La faccia concava funge generalmente da superficie di interazione, spesso con alfa-eliche, mentre il resto della struttura funge da impalcatura. La sequenza minima necessaria per il ripiegamento a ferro di cavallo in proteine con ripetizioni di 20-30 residui è LxxLxL [38-40].

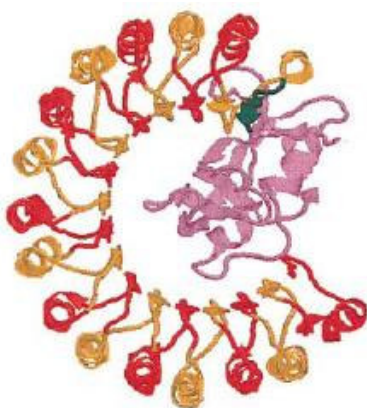


Figura 6. *Rappresentazione della struttura terziaria del dominio LRR dell'inibitore della ribonucleasi porcina.*

WD-40

Il dominio WD-40 (noto anche come ripetizioni della beta-transducina) è formato da sequenze ripetute di circa 40 aminoacidi, che terminano spesso con un dipeptide triptofano-aspartato. Normalmente il numero di unità ripetitive oscilla tra 4 e 16, ognuna delle quali formerebbe una struttura circolare a beta-elica [Figura 7]. Proteine con domini WD-40 sono state trovate in tutti gli eucarioti e sono implicate in una grande varietà di funzioni, tra cui trasduzione del segnale, regolazione della trascrizione, controllo del ciclo cellulare ed apoptosi.

Il compito principale dei domini WD-40 è quello di coordinare l'assemblaggio di complessi multiproteici, grazie all'azione da parte delle unità ripetitive come piattaforma per le interazioni tra proteine. La specificità delle proteine è invece determinata dalle sequenze esterne alle ripetizioni. Esempi di complessi contenenti domini WD-40 sono le proteine G (la cui subunità beta ha una struttura a beta-elica) e l'ubiquitina ligasi E3 [41-42].

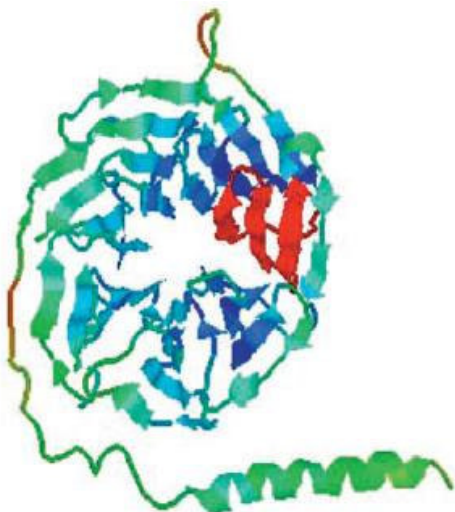


Figura 7. *Rappresentazione della struttura terziaria del dominio WD-40 della subunità beta delle proteine G.*

Dominio chinamico

I domini catalitici delle protein-chinasi consistono normalmente di 250-300 residui aminoacidici e contengono 12 sottodomini conservati che si ripiegano in un nucleo catalitico.

Il dominio chinamico, che ha la funzione di catalizzare l'aggiunta di gruppi fosfato, presenta una forma bilobata: la regione N-terminale comprendente i sottodomini I-IV, ha la funzione di legare e orientare i nucleotidi (da cui provengono i gruppi fosfato) e presenta una struttura predominante a beta-foglietto; la regione C-terminale (che accoglie i sottodomini da VIA a XI) responsabile del legame col substrato, presenta una prevalenza di motivi ad alfa-elica. La cavità tra i due lobi, in corrispondenza del quinto sottodominio, funge invece da sito catalitico [Figura 8].

Il dominio chinamico contiene numerosi elementi molto conservati nella scala evolutiva: tra essi, hanno un ruolo essenziale un residuo di lisina nel sottodominio II, in posizione N-terminale, adiacente ad una regione ricca in glicina, ritenuto essenziale per il legame all'ATP, e un aspartato, presente nella parte centrale del dominio chinamico, decisivo per l'attività catalitica [43-44].

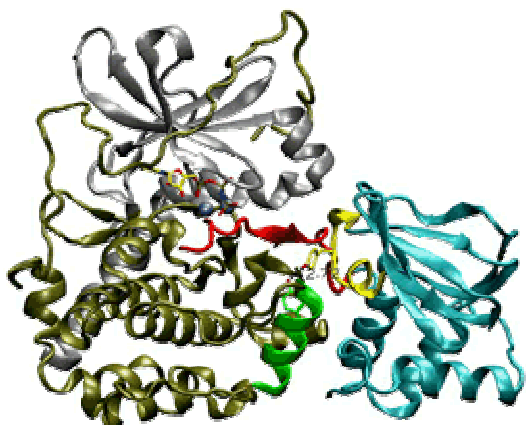


Figura 8. Rappresentazione della struttura terziaria della protein-chinasi A.

Bibliografia

1. Dauer, W. and Przedborski, S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, **39**, 889-909.
2. Mouradian, M.M. (2002) Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson disease. *Neurology*, **58**, 179-85.
3. Farrer, M.J. (2006) Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nat Rev Genet*, **7**, 306-18.
4. Vila, M. and Przedborski, S. (2004) Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat Med*, **10 Suppl**, S58-62.
5. Ramirez, A., Heimbach, A., Grundemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L.P., Goebel, I., Mubaidin, A.F., Wriekat, A.L., Roeper, J. *et al.* (2006) Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nature genetics*, **38**, 1184-91.
6. Zimprich, A., Biskup, S., Leitner, P., Lichtner, P., Farrer, M., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Uitti, R.J., Calne, D.B. *et al.* (2004) Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*, **44**, 601-7.
7. Paisan-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E.W., Gilks, W.P., Simon, J., van der Brug, M., Lopez de Munain, A., Aparicio, S., Gil, A.M., Khan, N. *et al.* (2004) Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*, **44**, 595-600.

8. Adams, J.R., van Netten, H., Schulzer, M., Mak, E., McKenzie, J., Strongosky, A., Sossi, V., Ruth, T.J., Lee, C.S., Farrer, M. *et al.* (2005) PET in LRRK2 mutations: comparison to sporadic Parkinson's disease and evidence for presymptomatic compensation. *Brain*, **128**, 2777-85.
9. Bonifati, V. (2006) Parkinson's Disease: The LRRK2-G2019S mutation: opening a novel era in Parkinson's disease genetics. *Eur J Hum Genet*.
10. Lesage, S., Durr, A. and Brice, A. (2006) LRRK2: a link between familial and sporadic Parkinson's disease? *Pathol Biol (Paris)*.
11. Smith, W.W., Pei, Z., Jiang, H., Dawson, V.L., Dawson, T.M. and Ross, C.A. (2006) Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. *Nature neuroscience*, **9**, 1231-3.
12. West, A.B., Moore, D.J., Biskup, S., Bugayenko, A., Smith, W.W., Ross, C.A., Dawson, V.L. and Dawson, T.M. (2005) Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 16842-7.
13. Eberhardt, O. and Schulz, J.B. (2003) Apoptotic mechanisms and antiapoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease. *Toxicol Lett*, **139**, 135-51.
14. Tatton, W.G., Chalmers-Redman, R., Brown, D. and Tatton, N. (2003) Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol*, **53 Suppl 3**, S61-70; discussion S70-2.
15. Jellinger, K.A. and Stadelmann, C. (2000) Mechanisms of cell death in neurodegenerative disorders. *Journal of neural transmission*, **59**, 95-114.

16. Hanrott, K., Gudmunsen, L., O'Neill, M.J. and Wonnacott, S. (2006) 6-hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase Cdelta. *J Biol Chem*, **281**, 5373-82.
17. Smith, W.W., Pei, Z., Jiang, H., Moore, D.J., Liang, Y., West, A.B., Dawson, V.L., Dawson, T.M. and Ross, C.A. (2005) Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 18676-81.
18. Greggio, E., Jain, S., Kingsbury, A., Bandopadhyay, R., Lewis, P., Kaganovich, A., van der Brug, M.P., Beilina, A., Blackinton, J., Thomas, K.J. *et al.* (2006) Kinase activity is required for the toxic effects of mutant LRRK2/dardarin. *Neurobiol Dis*, **23**, 329-41.
19. Hengartner, M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**, 770-6.
20. Cozzolino, M., Ferraro, E., Ferri, A., Rigamonti, D., Quondamatteo, F., Ding, H., Xu, Z.S., Ferrari, F., Angelini, D.F., Rotilio, G. *et al.* (2004) Apoptosome inactivation rescues proneural and neural cells from neurodegeneration. *Cell Death Differ*, **11**, 1179-91.
21. Taylor, J.P., Mata, I.F. and Farrer, M.J. (2006) LRRK2: a common pathway for parkinsonism, pathogenesis and prevention? *Trends Mol Med*, **12**, 76-82.
22. Wszolek, Z.K., Pfeiffer, R.F., Tsuboi, Y., Uitti, R.J., McComb, R.D., Stoessl, A.J., Strongosky, A.J., Zimprich, A., Muller-Myhsok, B., Farrer, M.J. *et al.*

- (2004) Autosomal dominant parkinsonism associated with variable synuclein and tau pathology. *Neurology*, **62**, 1619-22.
23. Galter, D., Westerlund, M., Carmine, A., Lindqvist, E., Sydow, O. and Olson, L. (2006) LRRK2 expression linked to dopamine-innervated areas. *Ann Neurol*, **59**, 714-9.
 24. Melrose, H., Lincoln, S., Tyndall, G., Dickson, D. and Farrer, M. (2006) Anatomical localization of leucine-rich repeat kinase 2 in mouse brain. *Neuroscience*, **139**, 791-4.
 25. Taymans, J.M., Van den Haute, C. and Baekelandt, V. (2006) Distribution of PINK1 and LRRK2 in rat and mouse brain. *J Neurochem*, **98**, 951-61.
 26. Simon-Sanchez, J., Herranz-Perez, V., Olucha-Bordonau, F. and Perez-Tur, J. (2006) LRRK2 is expressed in areas affected by Parkinson's disease in the adult mouse brain. *Eur J Neurosci*, **23**, 659-66.
 27. Macleod, D., Dowman, J., Hammond, R., Leete, T., Inoue, K. and Abeliovich, A. (2006) The Familial Parkinsonism Gene LRRK2 Regulates Neurite Process Morphology. *Neuron*, **52**, 587-93.
 28. Cozzolino, M., Ferri, A., Ferraro, E., Rotilio, G., Cecconi, F. and Carri, M.T. (2006) Apaf1 mediates apoptosis and mitochondrial damage induced by mutant human SOD1s typical of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*, **21**, 69-79.
 29. Mochizuki, H., Hayakawa, H., Migita, M., Shibata, M., Tanaka, R., Suzuki, A., Shimo-Nakanishi, Y., Urabe, T., Yamada, M., Tamayose, K. *et al.* (2001) An

- AAV-derived Apaf-1 dominant negative inhibitor prevents MPTP toxicity as antiapoptotic gene therapy for Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10918-23.
30. Wang, H., Yu, S.W., Koh, D.W., Lew, J., Coombs, C., Bowers, W., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M. and Dawson, V.L. (2004) Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death. *J Neurosci*, **24**, 10963-73.
 31. Biskup, S., Moore, D.J., Celsi, F., Higashi, S., West, A.B., Andrabi, S.A., Kurkinen, K., Yu, S.W., Savitt, J.M., Waldvogel, H.J. *et al.* (2006) Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain. *Ann Neurol*, **60**, 557-569.
 32. Gloeckner, C.J., Kinkl, N., Schumacher, A., Braun, R.J., O'Neill, E., Meitinger, T., Kolch, W., Prokisch, H. and Ueffing, M. (2006) The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity. *Hum Mol Genet*, **15**, 223-32.
 33. Abou-Sleiman, P.M., Muqit, M.M. and Wood, N.W. (2006) Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 207-19.
 34. Palacino, J.J., Sagi, D., Goldberg, M.S., Krauss, S., Motz, C., Wacker, M., Klose, J. and Shen, J. (2004) Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem*, **279**, 18614-22.

35. Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G. *et al.* (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, **304**, 1158-60.
36. Kim, R.H., Smith, P.D., Aleyasin, H., Hayley, S., Mount, M.P., Pownall, S., Wakeham, A., You-Ten, A.J., Kalia, S.K., Horne, P. *et al.* (2005) Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 5215-20.
37. Yaffe, M.B. and Elia, A.E. (2001) Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 131-8.
38. Enkhbayar P. *et al.* Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins. *Proteins* **54**, 394-403 (2004)
39. Kajava A.V. *et al.* The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 725-732 (2001)
40. Kajava A.V. *et al.* Assessment of the ability to model proteins with leucine-rich repeats in light of the latest structural information. *Protein Sci.* **11**, 1082-1090 (2002)
41. Li D. *et al.* WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 2085-2097 (2001)
42. Smith T.F. *et al.* The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 181-185 (1999)

- 43 Hanks S.K. *et al.* Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576-596 (1995)
- 44 Hanks S.K. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol.* **4**, 111 (2003)